

B1

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07K 14/47, C12N 15/12		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46245 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP00/00776	(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum:	1. Februar 2000 (01.02.00)		
(30) Prioritätsdaten: 199 05 128.3 1. Februar 1999 (01.02.99) DE 199 49 436.3 8. Oktober 1999 (08.10.99) DE			
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): SCHERRING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): CHRISTOPHERS, Enno [DE/DE]; Schlossgarten 12, D-24105 Kiel (DE). HARDER, Jürgen [DE/DE]; Esmarchstrasse 55, D-24105 Kiel (DE). SCHRÖDER, Jens [DE/DE]; Kleiner Bornkrug 7, D-24241 Blumenthal (DE).		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

(54) Title: HUMAN ANTIBIOTIC PROTEINS

(54) Bezeichnung: HUMANE ANTIBIOTISCHE PROTEINE

(57) Abstract

The invention relates to proteins, notably SAP-2 and SAP-3, having an antibiotic action. The invention also relates to a method for purifying certain antimicrobial proteins, as well as to a use of said antimicrobial proteins for antibiotic therapy or to a use of cells which were transfected with a DNA which codes for the proteins provided for in the invention.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Proteine, die antibiotisch wirksam sind. Es handelt sich um SAP-2 und SAP-3. Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten antimikrobiellen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der antimikrobiellen Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodiert.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Humane antibiotische Proteine

Die Erfindung betrifft Proteine / Peptide (Proteine), die antibiotisch wirksam sind. Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten 5 antibiotischen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die antibiotischen Proteine kodiert.

10

STAND DER TECHNIK:

Pathogene Mikroorganismen befinden sich gewöhnlich auf der Oberfläche von Epithelien. Dort haften sie an und vermehren sich. Gelegentlich dringen sie auch 15 in tiefere Gewebsschichten ein. Da die Immunantwort gegen diese pathogenen Mikroorganismen langsam einsetzt, ist es nicht verwunderlich, daß die Epithelzellen über eine Abwehr verfügen, mit Hilfe von sezernierten antimikrobiellen Substanzen gegen die Mikroorganismen vorzugehen. Einige dieser Substanzen führen zu einer Mangelernährung bei den Mikroorganismen, andere töten die Mikroorganismen ab, indem Strukturen der Mikroorganismen 20 zerstört werden.

Die Epithelien von Säugern sind normaler Weise nicht infiziert. Dennoch ist die Hautoberfläche von Bakterien und Pilzen dicht besiedelt. Es handelt sich dabei um haut - spezifische Mikroorganismen, die, wenn sie unter Kontrolle stehen, nicht pathogen sind.

25 Das erste bekannte, epithiale β - Defensin, das die Luftröhre der Rinder schützt, ist TAP, welches 64 Aminosäuren besitzt. (D.G. ZASLOFF et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, p 3952 – 3956). Dieses TAP vom Rind wirkt anti - bakteriell gegen *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* bei einer minimalen Inhibitorkonzentration von 30 12 – 50 μ g/ml. Auch *Candida albicans* wird zerstört. Hierbei handelt es sich um ein Protein, welches gewebespezifisch exprimiert wird.

Ein weiteres β - Defensin schützt die Zunge von Rindern, nämlich LAP, welches eine hohe Homologie zu TAP aufweist. (B.S. SCHONWETTER et al. (1995) Science Vol. 267, p 1645 – 1648)

35 Erst 1995 wurde das erste humane β - Defensin gefunden, welches hBD-1 genannt wird. (K.W. BENNSCH et al. (1995) FEBS Lett, Vol. 368, p 331 – 335) So besitzt hBD-1 eine anti - bakterielle Wirkung gegen Gram – negative Bakterien bei einer Konzentration von 60 bis 500 μ g/ml. (M. GOLDMAN et al. (1997) Cell.

Vol. 88, p 553 – 560) hBD-1 wird dominant in den Nieren exprimiert, jedoch auch andere epitheliale Gewebe sekretieren hBD-1.

Unabhängig von diesen Untersuchungen war von Interesse, was die Haut normalerweise gesund hält und warum die Haut selten infiziert wird. Das zweite 5 beim Menschen isolierte β - Defensin war das hBD-2, das aus 41 Aminosäuren besteht. (J. HARDER et al. (1997) Nature, Vol. 387, p 861) hBD-2 wirkte sehr effektiv gegen Gram – negative Bakterien mit einer LD₅₀ von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, wogegen bei Gram – positiven Bakterien der Wert bei über 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liegt. Das hBD-2 ist ein induzierbares Peptid, welches selbst durch einige hitzeinaktivierte Bakterien 10 induziert werden kann.

Ein weiteres humanes antibiotisches Protein ist das ALP, ein Proteaseinhibitor (J.A. KRAMPS et al. (1988) Biol. Chem. Hoppe Seyler, Vol 369, p 83 – 87), das von Keratinozyten produziert wird und sich gegen einige Bakterien und Pilze richtet.

15 Die Angriffe der antibiotischen Protein sind sehr unterschiedlich. Eine Interaktion mit der Membran der Mikroorganismen sind üblich. Lipophile Strukturen vieler antibiotischer Protein und der Defensine sprechen für ein Interkalieren in den Membranen oder ein Penetrieren der Membranen. Die antimikrobiellen Proteine 20 und Peptide wirken erst in den Mikroorganismen selbst toxisch.

AUFGABEN UND LÖSUNG:

Aufgabe der Erfindung ist es, weitere humane, antibiotische Proteine und deren 25 Derivate anzubieten, welche wirksam gegen Mikroorganismen, insbesondere gegen Gram - negative und Gram - positive Bakterien, gegen Pilze und gegen Viren einsetzbar sind.

SEQUENZEN DER REIFEN PROTEINE

30 Die Aufgabe wird gelöst durch mindestens ein Protein,

- das als aktives, reifes Protein / Peptid (Protein) einer der folgenden Sequenzen aufweist:
 - SEQ ID NO: 1 (Sequenz Protokoll Nr. 1) (SAP-2); oder
 - SEQ ID NO: 2 (Sequenz Protokoll Nr. 2) (SAP-3);

35 oder

- das als aktives, reifes Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter a) genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei mindestens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder

insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,

oder

5 c) das als aktives, reifes Protein posttranskriptionale Modifikationen einer der Sequenzen unter a) und b) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven Proteins beeinflussen.

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Protein, das antimikrobiell und / oder antibiotisch wirksam ist.

10

Vorteilhaft ist ein erfindungsgemäßes Protein,
das antimikrobiell oder antibiotisch wirksam ist und
das eine Mobilität von 6 kDa in der SDS – Gelelektrophorese aufweist.

15

Mehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, das eine antibiotische Aktivität gegen *Escherichia coli* oder *Staph. aureus* in einer Konzentration von weniger als 100 µg/ml aufweist.

20

In der Literatur soll in Zukunft die Bezeichnung SAP-2 durch RNase 7 ersetzt werden, und der Begriff SAP-3 soll in Zukunft durch hBD-3 substituiert werden.

Sehr bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, welches ein mit der humanen Aminosäure – Sequenz versehenes Protein ist (vgl. SEQ ID NO: 1 bis 2).

25

Zu SEQ ID NO: 1

30

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 30 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 1. Bevorzugt sind Deletionen,

35

Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 20 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 10 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun Aminosäuren. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

Zu SEQ ID NO: 2

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 10 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 2. Bevorzugt sind Deletionen, 5 Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 6 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 4 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei Aminosäuren. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

10

SEQUENZEN DER REIFEN PROTEINE MIT SIGNALSEQUENZ

Die Aufgabe wird weiterhin gelöst durch mindestens ein Protein, das eine Signalsequenz und ein reifes erfindungsgemäßes Protein umfaßt,

d) wobei das Protein eine der folgenden Sequenzen aufweist:
15 (i) SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
(i) SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3);
oder
e) wobei das Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter d) ge-
nannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei wenigstens eine
20 Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder
insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des reifen aktiven Proteins
wesentlich zu beeinflussen,
oder
f) wobei das Protein posttranskriptionale Modifikationen einer der Sequenzen
unter d) und e) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven
25 reifen Proteins beeinflussen.

Zu SEQ ID NO: 3

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 35 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 3. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 23 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 12 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, 35 sieben, acht oder neun Aminosäuren. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

Zu SEQ ID NO: 4

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 13 Aminosäuren umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine des SEQ ID NO: 4. Bevorzugt sind Deletionen,

5 Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 8 Aminosäuren, mehr bevorzugt von bis zu 6 Aminosäuren, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier oder fünf Aminosäuren. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

10 Am meisten bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Protein, das ein rekombinantes Protein ist. Dabei können die Proteine glykosiliert sein, wenn es sich um SAP-2 oder eine Variante davon handelt.

15 Die erfindungsgemäßen Proteine umfassen die reifen Proteine und die entsprechenden Vorläuferproteine, welche sich aus einer Signalsequenz und der Sequenz des reifen Proteins zusammensetzen. Dabei geht die Signalsequenz der Sequenz des reifen Proteins voraus. Das reife Protein beginnt mit der zuvor genannten N - terminalen Sequenz unter Punkt a). Die Signalsequenz ist für die Durchdringung des endoplasmatischen Retikulums erforderlich

Ebenfalls ist es möglich, an den N - Terminus und / oder C - Terminus Schutzgruppen zu synthetisieren, welche aus der Peptidchemie bekannt sind.

20 25 Die **Schutzgruppe** des N - Terminus kann bestehen aus:
Alkyl-, Aryl-, Alkylaryl-, Aralkyl-, Alkylcarbonyl- oder Arylcarbonylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt sind Naphthoyl-, Naphthylacetyl-, Naphthylpropionyl-, Benzoylgruppe oder einer Acylgruppe mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen.

30 35 Die **Schutzgruppe** des C - Terminus kann bestehen aus:
Einer substituierte oder unsubstituierte Alkoxy- oder Aryloxygruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder aus einer Aminogruppe.

Weitere **Schutzgrupp n** - sowohl für den N - Terminus als auch für den C -
35 Terminus - sind in Houben-Weyl (1974) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage

beschrieben. Die Beschreibung der Schutzgruppen in der zitierten Literaturangabe ist Teil der Offenbarung.

Die Sequenz des erfindungsgemäßen Protein kann am N - terminalen und / 5 oder C - terminalen Ende an Stelle einer Schutzgruppe mit weiteren **Rahmen - Aminosäure - Sequenzen** (analog zu der Definition von „frame work“ bei Antikörpern) verbunden sein. Diese weiteren Rahmen - Aminosäure - Sequenzen sind für die Bindung des erfindungsgemäßen Protein nicht wesentlich, sie können jedoch Träger von anderen Funktionen sein, so zum 10 Beispiel Chelate oder auch zytostatische oder zytotoxische Sequenzen umfassen. Derartige Rahmen - Aminosäure - Sequenzen treten in der Natur auf. Es kann sich dabei zum Beispiel um die zwischen den hypervariablen Bereichen angeordneten Sequenzen des variablen Bereichs eines Antikörper handeln. Diese Sequenzen werden als "Frame - Work" (Rahmensequenzen) 15 bezeichnet. Als Rahmen - Aminosäure - Sequenzen sind weiterhin nicht abgespaltene Teil- Signalsequenzen eines sezernierten eukaryotischen Proteins bekannt, wobei das Protein in einem Bakterium exprimiert wird. Derartige Signalsequenzen haben bisweilen keinen Einfluß auf die Funktion des nachfolgenden Proteins. Ebenfalls ist es möglich, erfindungsgemäße Proteine 20 hintereinander zu koppeln, wobei Rahmen - Aminosäure - Sequenzen zwischen den Einzelsequenzen angeordnet sind.

Um im Einzelfall zu entscheiden, ob ein bestimmtes erfindungsgemäßes Protein mit wenigstens einer Rahmen - Aminosäure - Sequenz und/oder wenigstens 25 einer Schutzgruppe zum Gegenstand der Erfindung zählt, ist ein Vergleich zwischen

- (i) diesem Protein **mit** Rahmen - Aminosäure - Sequenz und/oder **mit** Schutzgruppe und
- (ii) demselben Protein **ohne** Rahmen - Aminosäure - Sequenz und **ohne** 30 Schutzgruppe

anzustellen. Dabei sollten beide verglichenen Moleküle im wesentlichen dieselben Funktionen der Inhibierung oder Bindung aufweisen.

cDNA ODER DNA KODIEREND FÜR DIE ERFINDUNGSGEMÄßen PROTEINE

Die Erfindung umfaßt weiterhin auch eine cDNA oder DNA,

aa) wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Aminosäure - Sequenzen
5 kodiert:

- (i) SEQ ID NO: 1 (SAP-2);
- (ii) SEQ ID NO: 2 (SAP-3);
- (iii) SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
- (iv) SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3)

10 oder

bb) wobei die cDNA oder DNA allelische Modifikationen einer der Amino-
nosäure - Sequenzen unter aa) kodiert,
worin wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz
15 substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des
aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen.

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein reifes erfindungsgemäßes Protein kodieren.

20 Die allelischen Modifikationen sind zuvor unter dem Punkt "Sequenzen der reifen Proteine" definiert worden.

Zu SEQ ID NO: 1 und 3

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder
25 die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs der SEQ ID NO: 1 und 3. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf,
30 sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt, vielmehr sind auch im Labor entstandene (nicht in der Natur selbst vorkommende) Veränderungen der Aminosäure – Sequenz möglich.

Zu SEQ ID NO: 2 und 4

35 Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs der SEQ ID NO: 2 und 4. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden,

mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung eine cDNA oder DNA,

cc) wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:

10 (i) SEQ ID NO: 5 (cDNA-SAP-2)
(ii) SEQ ID NO: 6; (cDNA-SAP-3);

oder

dd) wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter cc) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, 15 deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter cc) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

Zu SEQ ID NO: 5

20 Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 5. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, 25 Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt.

Zu SEQ ID NO: 6

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder 30 die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßen DNAs des SEQ ID NO: 6. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 35 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren umfassen.

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein erfindungsgemäßes Protein kodieren.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung umfaßt eine cDNA oder DNA,

ee) wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen

5 aufweist:

- (i) SEQ ID NO: 7 (cDNA-PreSAP-2) oder
- (ii) SEQ ID NO: 8 (cDNA-PreSAP-3),

oder

ff) wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter ee) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter ee) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

Bevorzugt sind cDNA und DNA, die ein erfindungsgemäßes Präprotein 15 kodieren.

Zu SEQ ID NO: 7

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und/oder die Insertionen von bis zu 90 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der 20 erfindungsgemäßigen DNAs des SEQ ID NO: 5. Bevorzugt sind Deletionen, Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 60 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 30 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei, drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht oder neun oder 10 bis 29 Nukleotiden. Die allelischen 25 Modifikationen sind nicht auf die natürlich vorkommenden Allele begrenzt.

Zu SEQ ID NO: 8

Alle allelischen Modifikationen, die die Substitutionen, die Deletionen und / oder die Insertionen von bis zu 30 Nukleotiden umfassen, gehören zur Gruppe der erfindungsgemäßigen DNAs des SEQ ID NO: 6. Bevorzugt sind Deletionen, 30 Substitutionen und/oder Insertionen von bis zu 18 Nukleotiden, mehr bevorzugt von bis zu 12 Nukleotiden, am meisten bevorzugt sind die Deletionen, Substitutionen und / oder Insertionen von einer, zwei oder drei oder 4 bis 11 Nukleotiden. Auch hier gilt die zuvor erwähnte Erweiterung auf Veränderungen, die neben den natürlich vorkommenden auch die künstlich herstellbaren 35 umfassen.

Alle DNA-Konstrukte zählen auch dann zu den aufgezählten erfindungsgemäßigen Sequenzen, wenn solche Nukleotide ausgetauscht werden, die aufgrund

des degenerierten Kodes dieselbe Aminosäure kodieren. Der Austausch der artiger Nukleotide ist offensichtlich und die sich entsprechenden Aminosäuren sind in jedem Biochemie - Lehrbuch offenbart. (R. KNIPPERS, 1982, 3. Auflage, Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag)

5

Die allelische Modifikationen sind zuvor definiert worden.

Wenn die Aktivität des Proteins angegeben wird, um festzustellen, ob die allelische Modifikation unter die Gruppe der erfindungsgemäßen Proteine zählt, so ist immer das reife Protein zu messen, auch wenn die Signalsequenz ebenfalls

10 angeführt ist. Sollte die Signalsequenz angegeben sein, so ist die Funktion immer an dem Protein zu messen, das nach Entfernen der Signalsequenz erhalten wird.

Die Aktivität der erfindungsgemäßen Proteine mißt sich an seiner Funktion, die eine antibiotische Wirkung, eine antimikrobielle Wirkung, und / oder die Bindung

15 an gegen das reife humane Protein gerichtete Antikörper oder Bindungsmoleküle sein kann.

Weiterhin umfaßt die Erfindung Bindungsmoleküle (zum Beispiel Peptide oder deren Derivate), Einzelketten - Proteine (Single Chain Proteins), Antikörper oder
20 Fragmente der Antikörper, die Domänen auf dem reifen, erfindungsgemäßen Protein spezifisch erkennen. Wenn das gereinigte erfindungsgemäße Protein vorliegt, ist es für den Fachmann leicht möglich, monoklonale Antikörper herzustellen. Dabei wird die bekannte Methode von Köhler und Milstein und deren Weiterführungen angewendet. Im Einzelnen wird in konventioneller Methode
25 eine Maus mit dem gereinigten Protein mehrfach immunisiert, die Milzzellen entnommen und mit geeigneten Tumorzellen fusioniert. Die Hybride werden anschließend selektiert. Die Bindungsmoleküle können als Diagnostikum eingesetzt werden, um zum Beispiel festzustellen, ob der jeweilige Patient an einem Mangel oder einer Variante der erfindungsgemäßen Proteine leidet.

30

Die Protein der Erfindung können zum Beispiel aus Hornschuppen von Psoriasis Patienten isoliert werden. Die Reinigung erfolgt gemäß der Beispiele. Die Proteine haben die zuvor beschriebene Aminosäure - Sequenzen. Sie haben ein Molekulargewicht von ca. 20000 ± 2000 bei SAP – 2 und 6000 ± 2000 bei SAP
35 – 3 (siehe Beispiele). Der isoelektrische Punkt liegt im Bereich von pH 8,5 bis 10,5, wenn die im Beispiel beschriebene Methode angewendet wird.

Die erfindungsgemäßen Proteine können natürlichen Ursprungs sein. Die Proteine werden gewonnen, indem sie gemäß der Beispiele geerntet und

aufgearbeitet werden. Der Hornschuppenüberstand wird gereinigt und die erfindungsgemäßen Proteine isoliert und angereichert. Alle Anreicherungsstufen der Isolierung und der Reinigung sind Teil der Erfindung. Bevorzugt sind die Anreicherungsstufen der Isolierung und Reinigung, bei 5 denen die erfindungsgemäßen Proteine zu pharmazeutischen Zwecken verwendet werden können. So werden Reinigungen von 50 % der Proteine bezogen auf das Gesamtprotein erzielt, bevorzugt sind 85 %, mehr bevorzugt 95 % und am meisten bevorzugt 99 % der Proteine bezogen auf das Gesamtprotein.

10

Ebenso ist es möglich, die erfindungsgemäßen Proteine synthetisch herzustellen. Dazu zählt die Proteinsynthese nach J.M. SEWART and J.D. YOUNG, San Francisco, 1969 and J. MEIENHOFER, Hormonal Proteins and Peptides Vol. 2 p 46, Academic Press (New York), 1973 und E. SCHODER and K. 15 LUBKE, The Peptides, Vol. 1, Academic Press (New York) 1965. Die Zitate sind Teil der Offenbarung.

Zu den synthetisch hergestellten Proteinen zählen auch die rekombinanten Proteine, die nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Je nach Wirtsorganismus können die erfindungsgemäßen Protein (bei SAP – 2) 20 glykosyliert oder, wenn sie in Prokaryonten synthetisiert werden, unglykosyliert sein.

Die Funktion der Toxizität gegen Mikroorganismen ist in verschiedenen Testsystemen zu ermitteln. In den Beispielen sind gängige Testverfahren beschrieben. (vgl. SELSTED et al. (1993) J. Biol. Chem., Vol. 268, p 6641 – 25 6648 und GANZ et al. (1985) J. Clin. Invest. Vol. 76, p 1427 – 1435)

Die Proteine der Erfindung wirken antibiotisch gegen Mikroorganismen, insbesondere gegen die Gram - negativen und Gram - positiven Familien, dabei 30 bevorzugt gegen die Arten *E. coli* und *Staphylococcus aureus*.

Die Testsysteme sind ausführlich in Beispiel 3 beschreiben.

VEKTOREN MIT DER ERFINDGSGEMÄßen DNA

Ein weiterer Teil der Erfindung ist ein Vektor, der eine erfindungsgemäße cDNA oder DNA, weiterhin einen passenden Promotor und gegebenenfalls einen passenden Enhancer enthält. Ebenfalls kann auch noch eine Signal - Sequenz umfaßt sein. Vektoren sind ausführlich in den europäischen Publikationen EP 0 480 651, EP 0 462 632 und EP 0 173 177 beschrieben.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung besteht in einer eukaryontischen oder prokaryontischen Wirtszelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist.

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen Proteins unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, mit den Schritten:

- Kultivieren der Wirtszelle,
- Anreichern des Proteins, und
- Reinigen des Proteins.

Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zum Synthetisieren von einem der erfindungsgemäßen Proteine, wobei nach der Festphasen – Methode oder nach der Flüssigphasen – Methode die Proteine synthetisiert werden.

Das Verfahren, bei dem die erfindungsgemäßen Protein hergestellt werden, hat die folgenden Stufen:

das Carboxyl - Ende einer zu koppelnden Aminosäure, deren Aminogruppen und gegebenenfalls funktionellen Gruppen der Seitenkette eine Schutzgruppe tragen, reagiert mit dem freien Amino - Ende der zu koppelnden Aminosäure oder des zu koppelnden Proteinfragments in Gegenwart eines Kondensationsreagenzes,

und

im Falle einer nicht - endständigen Aminosäure wird anschließend die α - Amino - Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten und werden weitere Aminosäuren an die zu synthetisierende Protein - Kette nach den zuvor beschriebenen beiden Schritten gekoppelt

oder

im Falle einer endständigen Aminosäure wird gegebenenfalls anschließend die α - Amino - Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten

und

- 5 nach Kopplung der letzten Aminosäure im Falle der Festphasen - Methode wird das Protein von der Festphase abgespalten.

ALLELISCHE MODIFIKATIONEN

- 10 Die meisten Deletionen, Insertionen und Substitutionen scheinen keine durchgreifende Änderung in der Charakteristik des Proteins der Erfindung zur Folge zu haben. Da es schwer ist, den genauen Effekt einer Substitution, einer Deletion oder einer Insertion im voraus anzugeben, muß die Funktion des veränderten Proteins mit der Funktion des erfindungsgemäßigen Proteins verglichen werden.
- 15 Die hierfür zu verwendenden Methoden sind in den Beispielen angegeben. Als Standard dient das Protein gemäß der SEQ ID NO: 1 bis 2, ebenfalls auch das Protein, das nach Beispiel 1 oder 2 gereinigt wird, und auch die Reinigungsmethode des Beispiels 1 oder 2 für das Vergleichsprotein.
- 20 Der genetische Code ist degeneriert, das bedeutet, daß die meisten Aminosäuren von mehr als einem Codon aus drei Nukleotiden kodiert werden. Daher führen einige allelische Modifikationen auf der Ebene der Nukleotide nicht zu einer Änderung der Aminosäure - Sequenz. Daher ereignen sich allelische Modifikationen vornehmlich auf der Ebene der DNA und können sich sekundär 25 auf die Aminosäure - Sequenz auswirken.

Die cDNA- oder DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßigen Proteine kodieren, können gemäß konventioneller Techniken modifiziert werden, um Varianten der erfindungsgemäßigen Proteine herzustellen, die im wesentlichen die gleiche 30 Aktivität wie die beschriebenen und charakterisierten Proteine der Erfindung besitzen. Dabei wird die Aktivität so gemessen, wie es in den Beispielen beschrieben ist. Eine derartige Homologie – Austestung wird in CUNNINGHAM et al. (1989) Science, Vol. 243, p 1330 und O'DOWD et al. (1988) J. Biol. Chem., Vol. 263, p 15985 beschrieben.

35 Aminosäuren können substituiert werden, wobei mit einem Protein- oder Peptid-Mapping die Aminosäuren in ihren Positionen substituiert werden können, wobei anschließend die Aktivität der Modifizierung gemessen wird. Hierbei sind

experimentell ermittelbare Substituierungen möglich, die aufgrund der chemischen Struktur der Seitenketten nicht ohne weiteres voraussagbar ist.

Die Mutationen werden durch die Homologie (Similarity) zweier zum Vergleich
5 anstehender Proteine definiert. Der Ausdruck Homologie umfaßt ähnliche Aminosäuren und Lücken in den Sequenzen der Aminosäuren (Homologie = similarity). Die erfindungsgemäßen Proteine haben Aminosäure - Sequenzen, die eine Homologie von wenigstens 80 %, bevorzugt 90 %, mehr bevorzugt 95 % und am meisten bevorzugt 98 % der erfindungsgemäßen Strukturen besitzt,
10 wie sie durch die Sequenzen unter SEQ ID NO: 1 bis 2 oder SEQ ID NO: 3 und 4 definiert sind und wie sie weiterhin nach der Reinigung gemäß der Beispiele erhalten werden.

Sequenzen von Proteinen lassen sich einfach verändern. Dabei werden die
15 Aminosäuren in ihren jeweiligen Positionen ausgetauscht. Gleichzeitig ist notwendig, die so gewonnenen Sequenzen auf ihre Funktion hin zu untersuchen. Der Aminosäure – Austausch kann nach zwei verschiedenen Methoden erfolgen.

Jede der Position eines Proteins wird nacheinander durch Alanin ersetzt.
20 Anschließend wird die Funktion des jeweils um Alanin modifizierten Moleküls gemessen. Weicht der Meßwert von dem des Standard - Proteins ab, so ist diese Aminosäure an dieser Position des Proteins, an der nun ein Alanin angeordnet ist, für die Funktion essentiell. Hierdurch ergibt sich eine Karte des Proteins, aus der die konservativen Positionen und die einer Variation
25 zugänglichen Positionen angegeben sind.

Eine andere Methode besteht darin, jede Position oder wesentliche Positionen einer Proteins gegen alle 20 natürlichen Aminosäuren auszutauschen. Anschließend wird von all diesen Modifikationen die Funktion ausgetestet. Die
30 Methode wird beschrieben in Ronald FRANK (1992) Spot – Synthesis: easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. Tetrahedron Vol . 48, No 42, pp 9217 – 9232.

Beide Methoden sind besonders für Peptide geeignet, da diese mit der Festphasensynthese hergestellt werden. Dennoch lässt sich diese Methode mit Leichtigkeit auch für den Fachmann auf Proteine übertragen, wobei die Proteine
35 in Zellen synthetisiert werden. Hierbei ist die Veränderung der DNA wesentlich, die jedoch bei den heutigen Techniken gezielt erfolgen kann.

Das Verfahren zur Modifizierung der Aminosäure – Sequenz kann wie folgt ausgeführt werden:

- (a) Mindestens eine Aminosäure in der Sequenz des Proteins wird durch eine natürliche oder auch gegebenenfalls durch eine nicht natürliche Aminosäure ersetzt.
5
- (b) Das modifizierte Protein wird nach jeder Substituierung auf die antibiotische Funktion gegenüber Mikroorganismen ausgetestet und die am meisten antibiotischen Proteine werden selektiert.
- (c) In einem weiteren Schritt werden die am meisten antibiotischen Proteine mindestens in einem weiteren Zyklus gemäß der Punkte (a) und
10 (b) durchlaufen.

Das Resultat einer solchen Modifizierung kann ein Protein sein, welches mit der ursprünglichen Sequenz nur noch Teile gemeinsam hat.

15 Wie zuvor erwähnt, umfaßt die Erfindung auch Modifikationen der DNA oder cDNA. Diese modifizierten Sequenzen hybridisieren unter stringenten Bedingungen mit den DNA-Sequenzen, die die erfindungsgemäßen Proteine kodieren (siehe Sequenzen unter aa); cc) und ee)). Die cDNA- oder DNA-Sequenzen
20 haben Nukleotid - Sequenzen, die eine Identität einschließlich kurzer (bis 15 Nukleotide) Deletionen und Insertionen von wenigstens 70 %, bevorzugt 82 %, mehr bevorzugt 90 % und am meisten bevorzugt von 95 % mit den erfindungsgemäßen cDNA- oder DNA-Sequenzen besitzen (siehe aa), cc) und ee)). Die Identität einschließlich der kurzen (bis 15 Nukleotide) Deletionen und Insertionen kann durch eine Hybridisierung gemessen werden, wie sie in R.
25 KNIPPERS, Molekulare Genetik, 1982, dritte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York beschrieben ist. Außerdem sind Standard – Rechenprogramme dem Fachmann bekannt, mit deren Hilfe Homologie zu berechnen ist.

30 Die Erfindung umfaßt weiterhin eine cDNA oder DNA mit mindestens einer der Sequenzen von SEQ ID NO: 5 bis 8,
oder
Nukleotidsequenzen, die mit einer der SEQ ID NO: 5 bis 8 unter selektiven,
35 stringenten Bedingungen hybridisiert.
Stringente Bedingungen liegen dann vor, wenn die Salze, deren Konzentration, die Temperatur die anorganischen und organischen Lösungsmittel in typischer Form kontrolliert werden, wie dieses bei der etablierten Hybridisierungstechnik

praktiziert wird. Stringente Temperatur – Bedingungen schließen Temperaturen von mindestens 30 °C, bevorzugt mindestens 37 °C, mehr bevorzugt mindestens 45 °C, noch mehr bevorzugt mindestens 55 °C, noch vorteilhafter mindestens 65 °C und am meisten bevorzugt mindestens 70 °C ein. Stringente
5 Salzkonzentration umfassen weniger als 1000 mM, bevorzugt weniger als 700 mM, mehr bevorzugt weniger als 400 mM, noch mehr bevorzugt weniger als 300 mM, vorteilhafter weniger als 200 mM und am meisten bevorzugt 150 mM. Die Kombination der Parameter ist wichtiger als der Bezug auf einen einzelnen Parameter. (WETMUR et al. (1968) J. Mol. Biol., Vol. 31, p 349)

10

POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN

Unter den zuvor erwähnten posttranslationalen Modifikationen versteht man Veränderungen, die während oder nach der Translation auftreten. Hierzu zählen die Glykosylierung, die Ausbildung von Disulfid - Brücken, die chemische Modifikationen der Aminosäuren, so zum Beispiel die Sulfatierung, die im Zusammenhang mit dem Hirudin beschrieben ist. (J.W. FENTON (1989) "Thrombin Interactions with Hirudin", Seminars in Thrombosis and Hemostasis Vol. 15, p 265 – 268)
15 Die Glykosylierung ist eine wesentliche Funktion des endoplasmatischen Retikulums und/oder des Golgi-Apparates. Die Sequenz und die Verästelung der Oligosaccharide wird in dem endoplasmatischen Retikulum gebildet und in dem Golgi-Apparat verändert. Die Oligosaccharide können N-verknüpfte Oligosaccharide (Asparagin-verknüpfte) oder O-verknüpfte Oligosaccharide (Serin-,
20 Threonin- oder Hydroxylysin-verknüpfte) sein. Die Form der Glykosylierung ist von dem produzierenden Zelltyp und von der Art abhängig, von der der entsprechende Zelltyp stammt. Das Ausmaß und die Art der Glykosylierung kann durch Substanzen beeinflußt werden, wie es in der europäischen Publikation EP 0 222 313 beschrieben ist. Die Variation der Glykosylierung kann die Funktion
25 des Proteins verändern.
30 Proteine bilden häufig kovalente Bindungen innerhalb der Ketten aus. Diese Disulfid - Brücken werden zwischen zwei Cysteinen hergestellt. Dabei wird das Protein spezifisch gefaltet. Die Disulfid - Brücken stabilisieren die dreidimensionale Struktur der Proteine.

35

ISOLIERUNG UND HERSTELLUNG DER ERFINDUNGSGEMÄßen PROTEINE

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein Verfahren zur Reinigung von erfindungsgemäßen Proteinen, wobei das Verfahren aus folgenden Schritten besteht:

- (i) Extrahieren der Proteine aus natürlichen menschlichen Epithel – Zellen, transfizierten Zellen oder Hautschuppen oder Zellkulturen, die gegenüber Mikroorganismen gegebenenfalls exponiert wurden,
- (ii) Auftragen des Extraktes auf eine Affinitätssäule mit anschließender Reversed Phase HPLC und
Eluieren über einen Salzgradienten, mit Säuren oder organischen Eluenten,
oder
- (iii) Auftragen des Extraktes auf eine HPLC – Säule und Eluieren mit Salzen.

Die Reinigung ist ausführlich in den Beispielen beschrieben.
Bevorzugt ist eine Mikro – Mono S –HPLC – Säule.
Die Proteine werden bevorzugt gemäß Beispiel 1 und 2 gereinigt. Jedoch sind auch andere Isolierungs - und Reinigungsmethoden möglich:

- Methods of Enzymology, Volume 182: Guide to Protein Purification, ed. Murray P. DEUTSCHER, Academic Press, 1990;
- Protein Purification Application - A Practical Approach, ed. E.L.V. HARRIS and S. ANGEL, IRL-Press 1990;
- Protein Purification, Principles and Practice, Ropert SCOPES, Springer-Verlag 1982; and
- Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, ed. H.-C. JANSON and L. RYDEN, VCH publishers 1989.

VERWENDUNG ALS ARZNEIMITTEL

Die Proteine gemäß der Erfindung besitzen pharmakologische Effekte und sind deshalb als pharmazeutische Wirkstoffe verwendbar. Die Erfindung umfaßt ebenfalls ein Arzneimittel, das eines der erfindungsgemäßen Proteine oder ein Gemisch davon enthält. Weiterhin gehört zur Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der erfindungsgemäßen Proteine oder ein Gemisch erfindungsgemäßer Proteine enthält, in Gegenwart von pharmazeutisch verträglichen und annehmbaren Verbindungen und Trägern. Ebenfalls umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der

pharmazeutisch aktiven, erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und ein pharmazeutisch verträgliches Salz oder einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthält.

5 Insbesondere zeigen die erfindungsgemäßen Protein gemäß der SEQ ID NO: 1 bis 2 eine toxische oder antibiotische Wirkung gegenüber Mikroorganismen, insbesondere gegenüber den Gruppen der Gram - negativen und Gram - positiven Bakterien, bevorzugt bei den Arten *E. coli* und *St. aureus*.

Testverfahren sind in dem Beispiel 3 beschrieben.

10 Die Versuchsergebnisse dieser *in vitro* Tests zeigen, daß die erfindungsgemäßen Proteine als Arzneimittel oder zur medizinischen Behandlung verwendet werden können. Diese Versuchsergebnisse lassen sich von den *in vitro* Testsystemen auf ein *in vivo* System übertragen, da es sich bei den Tests um etablierte Versuchsanordnungen handelt. Die Proteine der Erfindung können deshalb zur Behandlung und Prävention von Infektionen durch Mikroorganismen dienen. Die Proteine der Erfindung können als ein antibiotisches Medikament bei Säugern, insbesondere Menschen, zur Behandlung von Infektionen und / oder zur Infektionsprophylaxe eingesetzt werden

20 Die Erfindung liefert weiterhin

(i) die Verwendung eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen;

25 (ii) ein Verfahren zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen, welches Verfahren eine Verabreichung einer Proteinmenge gemäß der Erfindung umfaßt, wobei die Menge die Krankheit unterdrückt, und wobei die Proteinmenge einem Patienten gegeben wird, der ein solches Medikament benötigt;

30 (iii) eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen, welche Behandlung eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger und Zusatz umfaßt.

Für diese therapeutische Wirkung sind unterschiedliche Dosen geeignet. Sie hängen beispielsweise von dem verwendeten Protein, von dem Wirt, von der Art der Verabreichung und von der Art und der Schwere der zu behandelnden Zustände ab. Im allgemeinen sind jedoch bei Tieren zufriedenstellende Resultate zu erwarten, wenn die tägliche Dosen einen Bereich von 2 µg bis 2000 µg pro kg Körpergewicht umfassen. Bei größeren Säugetieren, beispielsweise dem Menschen, liegt eine empfohlenen tägliche Dosis im Bereich von 2 bis 2000 µg pro kg Körpergewicht, wenn das nach Beispiel 1 oder 10 2 gereinigte Protein verwendet wird. Zum Beispiel wird diese Dosis zweckmäßiger Weise in Teildosen bis zu viermal täglich verabreicht. Die täglich Dosis bei Prävention beträgt ein zehntel der Menge, die bei einer Infektion eingesetzt wird.

Das erfindungsgemäße Protein wird bevorzugt lokal oder epithelial verabreicht, 15 so auch in den oberen und unteren Luftwegen.

Die erfindungsgemäßen Proteine können auf jedem üblichen Weg verabreicht werden, auch in Form von Cremen, Gele, halbfeste Arzneiformen, Suspensionen oder Inhalationslösungen oder Inhalationspulver.

20 Die vorliegende Erfindung stellt pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung, die eines der erfindungsgemäßen Proteine oder deren Gemisch und wenigstens einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Zusatz umfassen. Solche Zusammensetzungen können nach bekannten Verfahren 25 hergestellt werden. Dabei ist auf Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed Mack Publishing Company, East Pennsylvania (1980) hinzuweisen.

Weiterhin sind mit der erfindungsgemäßen DNA oder cDNA transfizierte 30 syngene oder allogene humane Zellen als Medikament einsetzbar, indem diese Zellen auf dem Epithelgewebe aufgetragen werden oder sich in der Matrix eines Wundverbandes befinden.

DEFINITIONEN:

35 „Antimikrobiell“ bedeutet, daß die erfindungsgemäßen Proteine
(i) das Wachstum und / oder die Proliferation von Mikroorganismen
inhibieren und / oder verhindern und / oder
(ii) die Mikroorganismen oder deren Strukturen zerstören.

„Antibiotisch“ bedeutet, daß die erfindungsgemäßen Proteine nachteilig auf die normalen biologischen Funktion der Mikroorganismen einwirken, wobei dieses Tod oder Zerstörung, ebenso auch Verhinderung von Wachstum oder Proliferation der Mikroorganismen, weiterhin auch Beeinträchtigung der Stoffwechselreaktionen bedeutet. Antibiotisch umfaßt somit den Begriff antimikrobiell. Eine antibiotische Wirkung kann auch bei Viren vorliegen. Daher umfaßt antibiotisch auch antiviral.

„Antiviral“ bedeutet, daß DNA - und RNA – Viren mit Hilfe der Proteine der Erfindung bekämpft werden können. Hierbei sind verschiedene Eingriffsmöglichkeiten sinnvoll. Die Viren in ihrer Ruheform können beeinflußt werden. Die Anhaftphase an oder das Eindringen in den Wirt kann gestört werden, der Aufenthalt oder die Vermehrung (temperante oder virulente Phase) in dem Wirt kann beeinträchtigt werden.

Die erfindungsgemäßen Proteine können auch zur Wundheilung eingesetzt werden.

„Wundheilung“ bedeutet, daß zum Beispiel die Kontraktion von Wunden beschleunigt wird, daß Bindegewebe im Wundbereich angesiedelt wird, daß Collagen angelagert wird. Ebenso sind Brandverletzung gut mit den Proteinen der Erfindung zu behandeln. Dabei kann ein Wundverband mit Proteinen angereichert sein oder Proteine von speziellen, insbesondere transfizierten Zellen im Wundverband exprimiert werden.

„Mikroorganismen“ umfassen die Prokaryonten mit Eubakterien und Archaeabakterien, die Pilze (Mycota mit Myxomyceten, Phycomyceten, und Eumyceten), die pflanzlichen und tierischen Einzeller, und Viren.

Der Ausdruck „Protein“ umfaßt alle Längen an Aminosäuresequenzen, somit auch Peptide. Dabei können sich die Proteine auch aus verschiedenen Ketten zusammensetzen, die durch kovalente Bindungen oder Van der Waal'sche Kräfte verbunden sind.

30

KOMBINATION MIT ANTIBIOTIKA:

Die erfindungsgemäßen Proteine können zusammen mit Antibiotika zum Beispiel aus der folgenden Gruppe verabreicht werden:
Bacitracin, Gramicidin, Polymyxin, Vancomycin, Teichoplanin, aminoglycoside, Penicillin, Monobactam.

Diagnostikum:

Die Erfindung umfaßt weiterhin die Verwendung von mindestens einem erfindungsgemäßen Protein zur Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon.

5

Ebenfalls umfaßt die Erfindung die Verwendung von einem erfindungsgemäßen Antikörper oder Fragment davon als Diagnostikum.

Dabei sollen die erfindungsgemäßen Protein in Körnergeweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Auch können damit
10 Nachweisverfahren durch Kopplung von Liganden an die erfindungsgemäßen Proteine hergestellt werden.

BEISPIELEBeispiel 1

Gewinnung von SAP-2

1.1. Isolierung:

5 50 g läisionaler Psoriasissschuppen wurde unter sauren Bedingungen bei Anwesenheit von Ethanol extrahiert und eingeengt. Dabei wurde dem Verfahren gefolgt, das beschrieben ist in J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296.

Nach Diafiltrieren gegen 0,02 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8 und 10 Zentrifugation wurde der Überstand an einer Bakterien – Affinitätssäule (*E. coli* oder *Staph. aureus*), die durch Kopplung hitze - inaktivierter (70 °C über eine Stunde) *E. coli* oder *Staphylococcus aureus* – Bakterien an N-hydroxysuccinimid – aktivierte Sepharose – Säule (Pharmacia) (10 x 5 mm) hergestellt worden war, chromatographiert.

15 Dazu wurde die Säule zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen und anschließend gebundene Proteine mit einem sauren Puffer (0,1 mol/l Glycin – Puffer, pH 3 mit 1 mol/l NaCl) eluiert.

Das gebundene Protein enthaltende Eluat wurde gegen 0,1 % wäßriger Trifluoressigsäure – Lösung diafiltriert und analog zur Isolierung von 20 chemotaktischen Peptiden (vgl. J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296) zunächst einer präparativen Reversed Phase HPLC – Trennung unterzogen. 20µl der jeweiligen Fraktionen wurden lyophilisiert, in 5 µl einer 0,01 prozentigen wäßrigen Essigsäure – Lösung aufgenommen und mit Hilfe eines Plattendiffusions - Testsystems (siehe 25 Beispiel 3) (zur Identifikation antimikrobieller oder antibiotischer Proteine) analog zu M. E. SELSTED et al. (1993) J. Biol. Chem., Vol. 268, p 6641 – 6648 hinsichtlich der Anwesenheit antimikrobieller Peptide (mit *Staph. aureus* und *E. coli* als Test – Bakterium) analysiert.

30 Bei 40 % Acetonitril eluierte, antimikrobiell aktive Proteine wurden anschließend - analog zur Isolierung chemotaktischer Peptide (J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296) - einer Mikro – Mono S – HPLC – Trennung mit Hilfe des Smart – HPLC – System unterzogen.

SAP-2 wurde bei 0,8 mol/l NaCl eluiert.

35 Eine anschließende Mikro – Reversed Phase – HPLC – Analyse mit Hilfe einer C – 18 RP – Säule ergab einen bei 52 % Acetonitril eluierenden Proteinpeak, der nach SDS – Gel - Elektrophorese (durchgeführt nach der Methode gemäß J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296 eine

einzelne Proteinbande oder zwei Banden entsprechend der Mobilität von zirka 20 kDa ergab.

5 1.2. Sequenzierung von Fragmenten

Sequenzierungsversuche ergaben die aminotermrale Sequenz mit der Numerierung aus der vollstndigen Sequenz.

```

10 Pro Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His Met
      5                      10                     15

15 Gln Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile Asn
      20                     25                     30

25 Lys His Thr Lys Arg Cys Lys Asp
      35

```

20 Der Edman Abbau des Peptidfragments lieferte eine Sequenz , die dem C – Terminus entspricht:

	Asp	Ser	Gln	Gln	Phe	His	Leu	Val	Pro	Val
					115					120
25	His	Leu	Asp	Arg	Val	Leu				
					125					

1.3. Biologische Aktivität von SAP-2: MIC

30 Antimikrobielle Aktivität gegen *Staph aureus*: < 100 µg/ml
gegen *E. coli*: < 50 µg/ml

RNase – Aktivität: 1.2 µg SAP – 2 verdaute in einer Stunde bei 37 °C zirka 5 µg humane RNA.

35

Beispiel 2

Gewinnung von SAP-3

2.1. Isolierung:

40 50 g läsionaler Psoriasisschuppen wurden unter sauren Bedingungen bei Anwesenheit von Ethanol extrahiert und eingeengt. Dabei wurde dem Verfahren

gefolgt das beschrieben ist in J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymology, Vol 288. p 266 – 296.

Nach Diafiltrieren gegen 0,02 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 8 und Zentrifugation wurde der Überstand an einer Anti – IL – 8 – Affinitätssäule, die 5 durch Kopplung des monoklonalen anti – IL – 8 Antikörpers 52E4 an N-hydroxy-succinimid – aktivierte Sepharose – Säulen (Pharmacia) hergestellt worden war, chromatographiert. (analog zu J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 287. p 216 – 230)

Dazu wurde die Säule zunächst mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen und 10 anschließend gebundene Proteine mit einem sauren Puffer (0,1 mol/l Glycin – Puffer, pH 3 mit 2 mol/l NaCl) eluiert.

Das gebundene Proteine enthaltende Eluat wurde gegen 0,1 % wäßriger Trifluoressigsäure – Lösung diafiltriert und analog zur Isolierung von 15 chemotaktischen Peptiden (vgl. J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296) zunächst einer präparativen Reversed Phase HPLC – Trennung unterzogen. 20 μ l der jeweiligen Fraktionen wurden lyophilisiert, in 5 μ l einer 0,1 prozentigen wäßrigen Essigsäure – Lösung aufgenommen und mit Hilfe eines Plattendiffusions - Testsystems (siehe 20 Beispiel 3) (zur Identifikation antimikrobieller oder antibiotischer Proteine) analog zu M.E. SELSTED (1993) J Biol. Chem., Vol. 268, p 6641- 6648 hinsichtlich der Anwesenheit antimikrobieller Peptide (mit *Staph. aureus* oder *E. coli* als Test – Bakterien) analysiert.

25 Bei 37 % Acetonitril eluierte, antimikrobiell aktive Proteine wurden anschließend - analog zur Isolierung chemotaktischer Peptide (J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296) - einer Mikro – Mono S – HPLC – Trennung mit Hilfe des Smart – HPLC – System unterzogen. SAP-3 wurde bei 0,79 mol/l NaCl eluiert.

30 Eine anschließende Mikro – Reversed Phase – HPLC – Analyse mit Hilfe einer C – 18 RP – Säule ergab einen bei 38 % Acetonitril eluierenden Proteinpeak, der nach SDS – Gel - Elektrophorese (durchgeführt nach der Methode gemäß J.M. SCHRÖDER, (1997) Methods in Enzymologie, Vol 288. p 266 – 296 eine 35 einzelne Proteinbande entsprechend der Mobilität von zirka 6 kDa ergab.

25

2.2. Sequenzierung von Fragmenten

Sequenzierungsversuche ergaben nur die aminotermrale Sequenz.

Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly
5 5 10 15

Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile
20 25 30

10 Gly Lys
32

2.3. Biologische Aktivität von SAP-3: MIC

15 Antimikrobielle Aktivität gegen *Staph aureus*: < 100 µg/ml
gegen *E. coli*: < 20 µg/ml

Beispiel 3

20 3. Bestimmung antimikrobieller Aktivität

3.1. Kultivierung der Mikroorganismen

Folgende Mikroorganismen wurden für die Versuche verwendet:

- *Escherichia coli* (*E. coli*) - ATCC (American Type Culture Collection) Nr. 11303
- 25 - *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC Nr. 15442
- *Staphylococcus aureus* (Klinische Isolate der Hautklinik – Kiel)
- *Staphylococcus epidermidis* (Klinische Isolate der Hautklinik – Kiel)
- *Candida albicans* (Klinische Isolate der Hautklinik – Kiel)

30 Die Mikroorganismen wurden auf Trypticase-Soy-Broth (TSB) - Agarplatten bei 37°C kultiviert. Wurden sie längere Zeit nicht benötigt, lagerten sie bei 4°C.
Für die Versuche wurde jeweils eine Einzelkolonie der entsprechenden Mikroorganismen in 40 ml TSB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (250 Upm) inkubiert. Zur Quantifizierung der Mikroorganismen

35 wurde die optische Dichte der Übernachtkulturen bei 620 nm (OD₆₂₀) gemessen und die Koloniezahl durch Ausplattieren von entsprechenden Verdünnungsstufen bestimmt

3.2. Plattendiffusions-Test

Um möglichst schnell und sensitiv Fraktionen der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritte (vgl. 3.3.) auf antimikrobielle Aktivität zu untersuchen, wurde ein radialer Plattendiffusions-Test (vgl. Hiemstra et al., 1993) verwendet.

Um Bakterien aus einer logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten, wurden 20 µl einer 40 ml Übernachtkultur von *E. coli* oder *Staphylococcus aureus* in 8 ml Trypticase – Soy – Broth (TSB) geimpft und 3,5 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden dann 10 min bei 1000 g abzentrifugiert, mit 4°C kalten Natrium-Phosphat-Puffer (10 mM, pH = 7,4) gewaschen, in 1 ml Natrium-Phosphat-Puffer resuspendiert und durch Bestimmung der OD₆₂₀ quantifiziert.

Etwa 1x10⁶ Bakterien wurden dann in 8 ml vorgewärmtes (42 °C) Agarose - Medium gegeben, welches sich aus 1% Agarose in Natrium-Phosphat-Puffer + 1% TSB-Medium (v/v) + 0,03% Tween 80 (v/v) zusammensetzte. Nach Einfüllen dieses mit Bakterien versetzten Agarose-Mediums in eine Petrischale ($\varnothing = 10\text{cm}$; Sarstedt, Newton) und anschließender Abkühlung bei Raumtemperatur, wurden in die nun verfestigte Agaroseschicht Löcher von 3 mm Durchmesser gestanzt. In diese Löcher wurden dann 5 µl der zu testenden Substanz in 0,01% Essigsäure gegeben.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde die Agaroseschicht mit 42°C warmen 2 x TSB-Medium + 1 % Agarose überschichtet und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 20 bis 24 Stunden konnte man die Hemmhöfe der antimikrobiellen oder antibiotischen Fraktionen im Bakterienrasen deutlich erkennen. Die relativen antimikrobiellen oder antibiotischen Aktivitäten wurden durch den jeweiligen Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt.

3.3. Flüssigkultur-Test

Um den dosisabhängigen Wirkungsbereich eines antimikrobiellen oder antibiotischen Proteins abschätzen zu können, wurde ein Flüssigkultur-Testsystem verwendet (vgl. Ganz et al., 1985).

Etwa 10 µl einer 1×10^7 /ml-Verdünnung der entsprechenden Mikroorganismen in Natrium-Phosphat-Puffer (vgl. 3.1.) wurden zu 80 µl Natrium-Phosphat-Puffer zusammen mit 1,25% TSB - Medium (v/v) gegeben. Hinzugefügt wurden 10 µl 0,01% Essigsäure mit den entsprechenden Konzentrationen des antimikrobiellen oder antibiotischen Proteins (100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, und 6,25 µg/ml).

Diese Ansätze wurden in einer 96-Loch-Platte (Becton Dickinson, Heidelberg) 3 h bei 37°C unter leichtem Schütteln (150 Upm) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden von je 50 µl der Ansätze zehnfache Verdünnungsreihen mit Natrium-Phosphat-Puffer erstellt und jeweils in 3 Parallelen auf TSB-Agarplatten ausplattiert (100 µl). Nach 24 bis 36 Stunden Wachstum wurden die Kolonien ausgezählt.

Als Kontrolle wurde je ein Ansatz nur mit 10 µl 0,01% Essigsäure (ohne Protein) einmal direkt vor der Inkubation und einmal nach 2 h Inkubation bei 37°C ausplattiert.

4. Versuchsergebnisse

SAP-3 wurde in den angegebenen Konzentrationen bei 37°C für 3 Stunden mit 5 • 10^4 KBE/ml (KBE = koloniebildende Einheiten) von *E. coli* und 20 *Staphylococcus aureus* in 100 µl 10 mM Natriumphosphat - Puffer (pH = 7,4) zusammen mit 1% TSB inkubiert (TSB = Trypticase-Soy-Broth). Die antimikrobielle Aktivität von SAP-3 wurde durch Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt. Zuvor wurden 100 µl der jeweiligen Ansätze in zehnfachen Verdünnungsstufen) auf TSB – Platten ausplattiert. Danach wurden 25 die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Es ergibt sich für *E. coli* und *Staphylococcus aureus* eine LD₉₀ von 2,5 - 5 µg/ml (LD₉₀ = letale Dosis von 90%; gibt den Konzentrationsbereich der jeweiligen antimikrobiellen Substanz an, bei dem es zu einer 90%-igen Reduktion der eingesetzten koloniebildenden Einheiten nach dreistündiger Inkubation mit 30 dieser antimikrobiellen Substanz kommt).

SAP-2 wurde in den angegebenen Konzentrationen bei 37°C für 3 Stunden mit 1 • 10^5 KBE / ml der jeweiligen Mikroorganismen in 100 µl 10 mM

Natriumphosphat - Puffer (pH = 7,4) zusammen mit 1% TSB inkubiert. Die antimikrobielle Aktivität von SAP-2 wurde durch Auszählung der KBE am nachfolgenden Tag bestimmt. Zuvor wurden 100 µl der jeweiligen Ansätze in zehnfachen Verdünnungsstufen) auf TSB – Platten ausplattiert. Danach wurden
5 die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Es ergibt sich eine LD₉₀ von 4 - 7,5 µg/ml für *Propionibacterium acnes*; 7,5 - 15 µg/ml für *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*; weiterhin 15 - 30 µg/ml für *Candida albicans*.

10

Beispiel 5**5. Biochemische Charakterisierung antimikrobieller oder antibiotischer Proteine mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

15

Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse wurde die Tricine-SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet (Schägger und Jagow, 1987), welche es gestattet, kleine Proteine unter 10 kDa sehr effizient aufzutrennen.

20

Die Durchführung geschah nach dem Protokoll der Autoren (Schägger und Jagow, 1987) in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer, wobei ein 16,5% Polyacrylamidgel mit einem Anteil von 6% Bisacrylamid und 6 M Harnstoff verwendet wurde.

25

Die Proben wurden vor dem Auftrag durch 0, 1 M DTT und Aufkochen denaturiert. Als molekularer Größenmarker diente der Standard S-17 (Sigma, St.Louis, USA). Nach dem Elektrophoreselauf wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen:

30

- Zuerst wurde das Gel 30 min fixiert (30% Ethanol, 10% Eisessig).
- Anschließend erfolgte eine 30 min Inkubation in "Farmer's reducer"- Lösung.
- Dann wurde das Gel 3 x 10 min mit H₂O gewaschen und 20 min in Silbernitratlösung gefärbt.
- Abschließend erfolgte eine 10-15 min Inkubation in Entwickler-Lösung.
- Die Entwicklung wurde durch 5% Essigsäure abgestoppt und das Gel anschließend photographiert.

Für eine schnelle Analyse der HPLC-Fraktionen wurde das SDS-Page-Phast-System (Pharmacia, Freiburg) mit fertigen High-Density-Gelen (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers benutzt. Als Größenmarker diente der S-17-Marker von Sigma (s.o.). Die Detektion der aufgetrennten Moleküle erfolgte mit
5 der oben beschriebenen Silberfärbung.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Protein,
 - 5 das als aktives, reifes Protein / Peptid (Protein) einer der folgenden Sequenzen aufweist:
SEQ ID NO: 1 (Sequenz Protokoll Nr. 1) (SAP-2); oder
SEQ ID NO: 2 (Sequenz Protokoll Nr. 2) (SAP-3);
oder
 - 10 das als aktives, reifes Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter a) genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei mindestens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,
oder
 - 15 das als aktives, reifes Protein posttranskriptionale Modifikationen einer der Sequenzen unter a) und b) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven Proteins beeinflussen.
- 20 2. Protein nach Anspruch 1, das antimikrobiell und / oder antibiotisch wirksam ist.
- 25 3. Protein nach Anspruch 1 oder 2, das eine Mobilität von 6 kDa in der SDS – Gelelektrophorese aufweist.
4. Protein, das eine Signalsequenz und ein reifes Protein nach einem der vorherigen Ansprüche umfaßt,
 - wobei das Protein eine der folgenden Sequenzen aufweist:
SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3);
oder
 - 30 wobei das Protein allelische Modifikationen einer der zuvor unter d) genannten Aminosäure - Sequenzen aufweist, wobei wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des reifen aktiven Proteins wesentlich zu beeinflussen,
oder
 - 35 wobei das Protein posttranskriptionale Modifikationen einer der Sequenzen unter d) und e) aufweist, die nicht wesentlich die Aktivität des aktiven reifen Proteins beeinflussen.

5. Protein nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei an dem N - Terminus und / oder C - Terminus Schutzgruppen angeordnet sind.
6. Protein nach einem der vorherigen Ansprüche, welches ein rekombinantes
5 Protein ist.
7. cDNA oder DNA,
wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Aminosäure - Sequenzen kodiert:
SEQ ID NO: 1 (SAP-2);
10 SEQ ID NO: 2 (SAP-3);
SEQ ID NO: 3 (PreSAP-2); oder
SEQ ID NO: 4 (PreSAP-3)
oder
wobei die cDNA oder DNA allelische Modifikationen einer der Aminosäure - Sequenzen
15 unter aa) kodiert,
worin wenigstens eine Aminosäure der Aminosäure - Sequenz substituiert, deletiert
oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des aktiven Proteins wesentlich zu
beeinflussen.
- 20 8. cDNA oder DNA nach Anspruch 7, wobei, die cDNA oder DNA ein reifes Protein
kodiert.
9. cDNA oder DNA,
wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen aufweist:
25 SEQ ID NO: 5; (cDNA-SAP-2)
SEQ ID NO: 6; (cDNA-SAP-3);
oder
wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen
unter cc) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert
30 ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der
Nukleotidsequenz unter cc) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.
10. cDNA oder DNA,
wobei die cDNA oder DNA eine der folgenden Nukleotidsequenzen besitzt:
35 SEQ ID NO: 7; (cDNA-PreSAP-2) oder
SEQ ID NO: 8 (cDNA-PreSAP-3),
oder

wobei die cDNA oder DNA eine allelische Modifikation einer der Nukleotidsequenzen unter ee) aufweist, wobei wenigstens ein Nukleotid substituiert, deletiert oder insertiert ist, ohne dabei die Aktivität des Proteins, das von der allelischen Modifikation der Nukleotidsequenz unter ee) kodiert wird, wesentlich zu beeinflussen.

5

11. Vektor, der eine cDNA oder DNA nach einem der Ansprüche 7 bis 10, weiterhin einen passenden Promotor und gegebenenfalls einen passenden Enhancer enthält.

10 12. Vektor nach Anspruch 11 in einer eukaryontischen oder prokaryontischen Wirtszelle, die mit dem Vektor transformiert ist.

13. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 6 als pharmazeutischer Wirkstoff.

15 14. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eines der Proteine nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Gemisch davon enthält, in Gegenwart von pharmazeutisch verträglichen und annehmbaren Verbindungen und Trägern.

20 15. Verfahren zum Synthetisieren von einem der Proteine nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6, wobei nach der Festphasen – Methode oder nach der Flüssigphasen – Methode die Proteine synthetisiert werden.

25 16. Bindungsmoleküle, Einzelketten - Proteine, Antikörper oder Fragmente der Antikörper, die Domänen auf dem reifen Protein nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6 spezifisch erkennen.

30 17. Verwendung eines der Proteine nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder deren Gemisch zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionen, die von Mikroorganismen verursacht wurden oder zur Prävention solcher Infektionen.

18. Wundverband

mit mindestens einem Protein nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6 oder

35 mit syngenen oder allogenen humanen Zellen, die mit der DNA oder cDNA nach einem der Ansprüche 7 bis 10 transfiziert sind.

19. Verwendung von mindestens einem Protein nach einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung von Antikörpern oder Fragmenten davon.

20. Verwendung von einem Antikörper oder Fragment davon nach Anspruch
5 19 als Diagnostikum.

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

NAME: Schering Aktiengesellschaft

STRASSE: Müllerstraße 178

STADT: Berlin

STAAT: Deutschland

POSTLEITZAHL: D-13342

TELEPHON: 030 / 4681 2515

TELEFAX: 030 / 4681 2058

(ii) TITEL DER ANMELDUNG: Humane antibiotische Proteine

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

(iv) COMPUTER LESBARE FORM:

MEDIUM TYP: Floppy Disk

COMPUTER: IBM PC kompatibel

ARBEITSSYSTEM: OC - DOS / MS – DOS

(2) INFORMATION ZU DEN SEQUENZEN

SEQ ID NO: 1

ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz

SEQUENZLÄNGE: 128 Aminosäuren

5 ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein SAP-2

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein

Lys Pro Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His
5 10 1510 Met Gln Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile
20 25 3015 Asn Lys His Thr Lys Arg Cys Lys Asp Leu Asn Thr Phe Leu His
35 40 45Glu Pro Phe Ser Ser Val Ala Ala Thr Cys Gln Thr Pro Lys Ile
50 55 6020 Ala Cys Lys Asn Gly Asp Lys Asn Cys His Gln Ser His Gly Pro
65 70 75Val Ser Leu Thr Met Cys Lys Leu Thr Ser Gly Lys Tyr Pro Asn
80 85 9025 Cys Arg Tyr Lys Glu Lys Arg Gln Asn Lys Ser Tyr Val Val Ala
95 100 105Cys Lys Pro Pro Gln Lys Lys Asp Ser Gln Gln Phe His Leu Val
30 110 115 120Pro Val His Leu Asp Arg Val Leu
125

35 SEQ ID NO: 2

ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz

SEQUENZLÄNGE: 45 Aminosäuren

ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein SAP-3

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

40 EIGENSCHAFTEN: Funktion von einem antibiotischen Protein

Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly
5 10 15Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile
45 20 25 30Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys
35 40 45

SEQ ID NO: 3

ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz

SEQUENZLÄNGE: 156 Aminosäuren

5 ART DES MOLEKÜLS: Präprotein SAP-2, Protein mit Signalsequenz

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein

	Met Ala Pro Ala Arg Ala Gly Phe Cys Pro Leu Leu Leu Leu		
10	-25	-20	-15
	Leu Leu Gly Leu Trp Val Ala Glu Ile Pro Val Ser Ala Lys Pro		
	-10	-5	-1 1
15	Lys Gly Met Thr Ser Ser Gln Trp Phe Lys Ile Gln His Met Gln		
	5	10	15
	Pro Ser Pro Gln Ala Cys Asn Ser Ala Met Lys Asn Ile Asn Lys		
	20	25	30
20	His Thr Lys Arg Cys Lys Asp Leu Asn Thr Phe Leu His Glu Pro		
	35	40	45
25	Phe Ser Ser Val Ala Ala Thr Cys Gln Thr Pro Lys Ile Ala Cys		
	50	55	60
	Lys Asn Gly Asp Lys Asn Cys His Gln Ser His Gly Pro Val Ser		
	65	70	75
30	Leu Thr Met Cys Lys Leu Thr Ser Gly Lys Tyr Pro Asn Cys Arg		
	80	85	90
	Tyr Lys Glu Lys Arg Gln Asn Lys Ser Tyr Val Val Ala Cys Lys		
	95	100	105
35	Pro Pro Gln Lys Lys Asp Ser Gln Gln Phe His Leu Val Pro Val		
	110	115	120
	His Leu Asp Arg Val Leu		
40	125		

SEQ ID NO: 4

ART DER SEQUENZ: Aminosäure - Sequenz
SEQUENZLÄNGE: 67 Aminosäuren
ART DES MOLEKÜLS: Präprotein, d.h. das reife Protein SAP-
5 3 mit Signalsequenz

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten
EIGENSCHAFTEN: als reifes Protein Funktion von einem
antibiotischen Protein

Met Arg Ile His Tyr Leu Leu Phe Ala Leu Leu Phe Leu Phe Leu
10 -20 -15 -10

Val Pro Val Pro Gly His Gly Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys
-5 -1 1 5

15 Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly Gly Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys
10 15 20

Leu Pro Lys Glu Glu Gln Ile Gly Lys Cys Ser Thr Arg Gly Arg
25 30 35

20 Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys
40 45

SEQ ID NO: 5

25 ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz
SEQUENZLÄNGE: 384 Nukleotide
ART DES MOLEKÜLS: reifes Protein kodierende cDNA für SAP-2
URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten
EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

30 AAG CCC AAG GGC ATG ACC TCA TCA CAG TGG TTT AAA ATT CAG CAC 045
ATG CAG CCC AGC CCT CAA GCA TGC AAC TCA GCC ATG AAA AAC ATT 090
35 AAC AAG CAC ACA AAA CGG TGC AAA GAC CTC AAC ACC TTC CTG CAC 135
GAG CCT TTC TCC AGT GTG GCC ACC TGC CAG ACC CCC AAA ATA 180
GCC TGC AAG AAT GGC GAT AAA AAC TGC CAC CAG AGC CAC GGG CCC 225
40 GTG TCC CTG ACC ATG TGT AAG CTC ACC TCA GGG AAG TAT CCG AAC 270
TGC AGG TAC AAA GAG AAG CGA CAG AAC AAG TCT TAC GTA GTG GCC 315
45 TGT AAG CCT CCC CAG AAA AAG GAC TCT CAG CAA TTC CAC CTG GTT 360
CCT GTA CAC TTG GAC AGA GTC CTT

SEQ ID NO: 6

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE: 135 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: das reife Protein kodierende cDNA für SAP-3

5 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

10 GGA ATC ATA AAC ACA TTA CAG AAA TAT TAT TGC AGA GTC AGA GGC 045

GGC CGG TGT GCT GTG CTC AGC TGC CTT CCA AAG GAG GAA CAG ATC 090

GGC AAG TGC TCG ACG CGT GGC CGA AAA TGC TGC CGA AGA AAG AAA 135

15

SEQ ID NO: 7

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE: 468 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: Präprotein kodierende cDNA für SAP-2, SAP-2 mit
20 Signalsequenz

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

25 ATG GCA CCG GCC AGA GCA GGA TTC TGC CCC CTT CTG CTG CTT CTG 045

CTG CTG GGG CTG TGG GTG GCA GAG ATC CCA GTC AGT GCC AAG CCC 090

AAG GGC ATG ACC TCA TCA CAG TGG TTT AAA ATT CAG CAC ATG CAG 135

30 CCC AGC CCT CAA GCA TGC AAC TCA GCC ATG AAA AAC ATT AAC AAG 180

CAC ACA AAA CGG TGC AAA GAC CTC AAC ACC TTC CTG CAC GAG CCT 225

TTC TCC AGT GTG GCC ACC TGC CAG ACC CCC AAA ATA GCC TGC 270

35 AAG AAT GGC GAT AAA AAC TGC CAC CAG AGC CAC GGG CCC GTG TCC 315

CTG ACC ATG TGT AAG CTC ACC TCA GGG AAG TAT CCG AAC TGC AGG 360

40 TAC AAA GAG AAG CGA CAG AAC AAG TCT TAC GTA GTG GCC TGT AAG 405

CCT CCC CAG AAA AAG GAC TCT CAG CAA TTC CAC CTG GTT CCT GTA 450

CAC TTG GAC AGA GTC CTT

468

45

SEQ ID NO: 8

ART DER SEQUENZ: Nukleotidsequenz

SEQUENZLÄNGE: 201 Nukleotide

ART DES MOLEKÜLS: das Präprotein kodierende cDNA für SAP-3
5 (Signalsequenz und reife Protein)

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: Hornschuppen von Psoriasis Patienten

EIGENSCHAFTEN: antibiotisches Protein kodierende cDNA

10 ATG AGG ATC CAT TAT CTT CTG TTT GCT TTG CTC TTC CTG TTT TTG 045
GTG CCT GTC CCA GGT CAT GGA GGA ATC ATA AAC ACA TTA CAG AAA 090
TAT TAT TGC AGA GTC AGA GGC GGC CGG TGT GCT GTG CTC AGC TGC 135
15 CTT CCA AAG GAG GAA CAG ATC GGC AAG TGC TCG ACG CGT GGC CGA 180
AAA TGC TGC CGA AGA AAG AAA 201

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C07K 14/47, C12N 15/12, 9/22, A61L 15/03	A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46245 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00776		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Internationales Anmeldedatum: 1. Februar 2000 (01.02.00)		
(30) Prioritätsdaten: 199 05 128.3 1. Februar 1999 (01.02.99) DE 199 49 436.3 8. Oktober 1999 (08.10.99) DE		
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): SCHERRING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).		
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): CHRISTOPHERS, Enno [DE/DE]; Schlossgarten 12, D-24105 Kiel (DE). HARDER, Jürgen [DE/DE]; Esmarchstrasse 55, D-24105 Kiel (DE). SCHRÖDER, Jens [DE/DE]; Kleiner Bornkrug 7, D-24241 Blumenthal (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. November 2000 (23.11.00)

(54) Title: HUMAN ANTIBIOTIC PROTEINS

(54) Bezeichnung: HUMANE ANTIBIOTISCHE PROTEINE

(57) Abstract

The invention relates to proteins, notably SAP-2 and SAP-3, having an antibiotic action. The invention also relates to a method for purifying certain antimicrobial proteins, as well as to a use of said antimicrobial proteins for antibiotic therapy or to a use of cells which were transfected with a DNA which codes for the proteins provided for in the invention.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Proteine, die antibiotisch wirksam sind. Es handelt sich um SAP-2 und SAP-3. Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten antimikrobiellen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der antimikrobiellen Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die erfindungsgemässen Proteine kodiert.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	F1	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/00776

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N9/22 A61L15/03		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	EP 0 943 679 A (INNOGENETICS NV) 22 September 1999 (1999-09-22) the whole document ----	1-17
P, X	WO 99 13080 A (ZYMOGENETICS INC) 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document ----	1-19
A	HARDER J: "A PEPTIDE ANTIBIOTIC FROM HUMAN SKIN" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, vol. 387, 26 June 1997 (1997-06-26), page 861 XP002072639 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ----	1-17
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
26 July 2000	10/08/2000	
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer	
European Patent Office, P.B. 5818 Patentdaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	De Kok, A	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/00776	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 268, 1998, pages 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US cited in the application page 286 -----	1
A	ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 18, 1996, pages 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 abstract page 3508 -page 3509 page 3511, column 2 page 3513, column 1, last paragraph -----	1,2,4,7, 9-11,13, 17
A	WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21 July 1994 (1994-07-21) claim 10 -----	1,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/00776

The International Searching Authority found that this international application contains multiple inventions, as follows :

1. Claims Nos. 1-20, all in part
SAP-2 protein, production and use thereof
2. Claims Nos.1-20, all in part
SAP-3 protein, production and use thereof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/00776

Continuation of box 1.2
Claims Nos.16,20

Claims Nos. 16 and 20 relate to a disproportionately large number of possible compounds of which only a small proportion are supported by the description according to the terms of Article 6 PCT and/or can be considered disclosed according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. For this reason, said claims were not searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/00776

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0943679	A 22-09-1999	AU 3411999	A 11-10-1999	
		WO 9947652	A 23-09-1999	
WO 9913080	A 18-03-1999	AU 9391598	A 29-03-1999	
		EP 1012285	A 28-06-2000	
WO 9415561	A 21-07-1994	AU 694092	B 16-07-1998	
		AU 3469993	A 15-08-1994	
		DE 69325721	D 26-08-1999	
		EP 0679076	A 02-11-1995	
		JP 8507702	T 20-08-1996	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. Nationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/00776

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N9/22 A61L15/03

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGSEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	EP 0 943 679 A (INNOGENETICS NV) 22. September 1999 (1999-09-22) das ganze Dokument	1-17
P, X	WO 99 13080 A (ZYMOGENETICS INC) 18. März 1999 (1999-03-18) das ganze Dokument	1-19
A	HARDER J: "A PEPTIDE ANTIBIOTIC FROM HUMAN SKIN" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, Bd. 387, 26. Juni 1997 (1997-06-26), Seite 861 XP002072639 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-17
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindender Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Rechercheberichts
26. Juli 2000	10/08/2000
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter De Kok, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Altenzeichen
PCT/EP 00/00776

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt Seite 286	1
A	ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz	1,2,4,7, 9-11,13, 17
A	WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21. Juli 1994 (1994-07-21) Anspruch 10	1,18

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p> <p>1. Ansprüche: 1-20, alle teilweise Protein SAP-2, seine Herstellung und seine Verwendung</p> <p>2. Ansprüche: 1-20, alle teilweise Protein SAP-3, seine Herstellung und seine Verwendung</p>	

WEITERE ANGABEN	PCT/SAV 210
Fortsetzung von Feld I.2	
Ansprüche Nr.: 16 20	
<p>Die geltenden Patentansprüche 16 und 20 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, von denen keiner als im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung gestützt und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht entsprechend gestützt und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher würden diese Ansprüche nicht recherchiert.</p> <p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In. nationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/00776

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0943679	A	22-09-1999	AU	3411999 A	11-10-1999
			WO	9947652 A	23-09-1999
WO 9913080	A	18-03-1999	AU	9391598 A	29-03-1999
			EP	1012285 A	28-06-2000
WO 9415561	A	21-07-1994	AU	694092 B	16-07-1998
			AU	3469993 A	15-08-1994
			DE	69325721 D	26-08-1999
			EP	0679076 A	02-11-1995
			JP	8507702 T	20-08-1996

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

GEÄNDERTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. August 2000 (10.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/46245 A3

(51) Internationale Patentklassifikation²: C07K 14/47.
C12N 15/12, 9/22, A61L 15/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00776

(22) Internationales Anmeldedatum:
1. Februar 2000 (01.02.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 05 128.3 1. Februar 1999 (01.02.1999) DE
199 49 436.3 8. Oktober 1999 (08.10.1999) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, D-13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): CHRISTOPHERS, Enno [DE/DE]; Schlossgarten 12, D-24105 Kiel (DE). HARDER, Jürgen [DE/DE]; Esmarchstrasse 55, D-24105 Kiel (DE). SCHRÖDER, Jens [DE/DE]; Kleiner Bonkrug 7, D-24241 Blumenthal (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK,

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *Mit internationalem Recherchenbericht.*

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. November 2000
Veröffentlichungsdatum des geänderten internationalen Recherchenberichts: 22. März 2001

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 12/2001 vom 22. März 2001, Section II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 00/46245 A3

(54) Title: HUMAN ANTIBIOTIC PROTEINS

(54) Bezeichnung: HUMANE ANTIBIOTISCHE PROTEINE

(57) Abstract: The invention relates to proteins, notably SAP-2 and SAP-3, having an antibiotic action. The invention also relates to a method for purifying certain antimicrobial proteins, as well as to a use of said antimicrobial proteins for antibiotic therapy or to a use of cells which were transfected with a DNA which codes for the proteins provided for in the invention.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Proteine, die antibiotisch wirksam sind. Es handelt sich um SAP-2 und SAP-3. Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von bestimmten antimikrobiellen Proteinen. Darüber hinaus bezieht sich die Erfindung auf eine Verwendung der antimikrobiellen Proteine zur antibiotischen Behandlung oder auf eine Verwendung von Zellen, welche mit einer DNA transfiziert wurden, die für die erfindungsgemäßen Proteine kodiert.

**REVISED
VERSION**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 00/00776

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N9/22 A61L15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	EP 0 943 679 A (INNOGENETICS NV) 22 September 1999 (1999-09-22) the whole document ---	1-17
P,X	WO 99 13080 A (ZYMOGENETICS INC) 18 March 1999 (1999-03-18) the whole document ---	1-19
A	HARDER J: "A PEPTIDE ANTIBIOTIC FROM HUMAN SKIN" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD, LONDON, vol. 387, 26 June 1997 (1997-06-26), page 861 XP002072639 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ---	1-17 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 2000

Date of mailing of the international search report

30 October 2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentam 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tz. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No	PCT/EP 98/00776
-------------------------	-----------------

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 268, 1998, pages 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US cited in the application page 286 ---	1
A	ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 24, no. 18, 1996, pages 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 abstract page 3508 -page 3509 page 3511, column 2 page 3513, column 1, last paragraph ---	1,2,4,7, 9-11,13, 17
A	WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21 July 1994 (1994-07-21) claim 10 -----	1,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/EP 00/00776**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: **16 20** because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See supplemental sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See annex

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/00776

Continuation of box 1.2
Claims Nos.16,20

Claims Nos. 16 and 20 relate to a disproportionately large number of possible compounds of which only a small proportion are supported by the description according to the terms of Article 6 PCT and/or can be considered disclosed according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible. For this reason, said claims were not searched.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e)PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Ref ID:	Application No
	PCT/EP 00/00776

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 0943679 A	22-09-1999	AU 3411999 A WO 9947652 A		11-10-1999 23-09-1999
WO 9913088 A	18-03-1999	AU 9391598 A EP 1012285 A		29-03-1999 28-06-2000
WO 9415561 A	21-07-1994	AU 694092 B AU 3469993 A DE 69325721 D EP 0679876 A JP 8507702 T		16-07-1998 15-08-1994 26-08-1999 02-11-1995 29-08-1996

**REVIDIERTE
FASSUNG**

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/00776

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N9/22 A61L15/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisie (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K C12N A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisie gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, STRAND

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	EP 0 943 679 A (INNOGENETICS NV) 22. September 1999 (1999-09-22) das ganze Dokument ---	1-17
P,X	WO 99 13080 A (ZYMOGENETICS INC) 18. März 1999 (1999-03-18) das ganze Dokument ---	1-19
A	HARDER J: "A PEPTIDE ANTIBIOTIC FROM HUMAN SKIN" NATURE, GB, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, Bd. 387, 26. Juni 1997 (1997-06-26), Seite 861 XP002072639 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-17
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam erachtet wird
- *'' Weiter Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweckmäßig erheben zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie zugeführt)
- *'' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *''' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

*' Spätliche Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie eingegeben ist

*'' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

*''' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

*''' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts

30. Oktober 2000

30. 10. 00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentseen 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

De Kok, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr	Sales Akten-Nr.
PCT/EP 00/08776	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Bezug auf kommen den Zeile	Betr. Anspruch Nr.
A	J-M SCHRÖDER: "Identification and structural characterization of chemokines in lesional skin material of patients with inflammatory skin disease" METHODS IN ENZYMOLOGY, Bd. 268, 1998, Seiten 266-296, XP000864768 SAN DIEGO US in der Anmeldung erwähnt Seite 286 ---	1
A	ROSENBERG H F ET AL: "MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL HUMAN RIBONUCLEASE (RNASE K6): INCREASING DIVERSITY IN THE ENLARGING RIBONUCLEASE GENE FAMILY" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, Bd. 24, Nr. 18, 1996, Seiten 3507-3513, XP002074516 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung Seite 3508 -Seite 3509 Seite 3511, Spalte 2 Seite 3513, Spalte 1, letzter Absatz ---	1,2,4,7, 9-11,13, 17
A	WO 94 15561 A (NEWMAN NANCY M) 21. Juli 1994 (1994-07-21) Anspruch 10 -----	1,18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PCT/EP 89/00776**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu denen Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. **16 28** weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 218
<p>Fortsetzung von Feld I.2</p> <p>Ansprüche Nr.: 16 20</p> <p>Die geltenden Patentansprüche 16 und 20 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, von denen keiner als im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung gestützt und/oder als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall sind die Patentansprüche nicht entsprechend gestützt und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher würden diese Ansprüche nicht recherchiert.</p> <p>Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inn. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00776

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0943679 A	22-09-1999	AU 3411999 A		11-10-1999
		WO 9947652 A		23-09-1999
WO 9913080 A	18-03-1999	AU 9391598 A		29-03-1999
		EP 1012285 A		28-06-2000
WO 9415561 A	21-07-1994	AU 694092 B		16-07-1998
		AU 3469993 A		15-08-1994
		DE 69325721 D		26-08-1999
		EP 0679076 A		02-11-1995
		JP 8507702 T		20-08-1996